

【様 式】

課程博士論文要旨

DE 9602 氏 名 河野牧子

論文題名 cDNAクローニングによるシンジュガイの殻体

形成に關与する遺伝子の研究

主査 佐俣哲郎

副査 松田基夫

山本静雄

炭酸塩の殻体を形成する無脊椎動物を中心とした生鉱物化 (biomineralization) は、二酸化炭素の固定化を通じた地球環境の変遷に深く係わる重要な研究領域である。軟体動物は、炭酸カルシウムを主体とした殻体を持つが、炭酸カルシウムの結晶形（アラレ石または方解石）と殻体微細構造は、系統と密接な関係をもつ。アコヤガイ (*Pinctada fucata*) やシロチョウガイ (*Pinctada maxima*) の殻体は、2層の微細構造から成り、内側に真珠光沢のあるアラレ石結晶から成る真珠層と、外側に真珠光沢のない方解石結晶から成る稜柱層を持つ。殻体には、炭酸カルシウム以外の成分として、有機基質 (organic matrix) と呼ばれるタンパク質を中心とした有機物が含まれており、これらの成分が殻体形成を制御していると考えられている。

Miyamoto *et al.* (1996) は、アコヤガイの真珠中の可溶性有機基質の主成分をコードする遺伝子の cDNA クローニングによる解析から、この成分の全アミノ酸配列を決定し、ナクレイン (nacrein) と命名した。その成分は、炭酸脱水

酵素 (CA:carbonic anhydrase) と相同性のあるドメインと、Gly-Xaa-Asn (Xaa=Asp, Asn or Glu) の繰り返し配列から成るドメインとから成る。このため、ナクレイン分子の CA ドメインの働きにより、炭酸イオンが濃集され、他方で、Gly-Xaa-Asn の繰り返し配列ドメインの働きにより、カルシウムイオンが濃集され、炭酸カルシウムの結晶成長に結びつくと考えられた。しかし、繰り返し配列ドメインとカルシウムイオンの親和性には根拠が無く、また、ナクレインから実際に炭酸カルシウム (アラレ石) 結晶が誘導されたという報告もない。このため、ナクレインが真珠 (真珠層) の形成に不可欠な要素であるかどうかは不明である。

アコヤガイ殻体の真珠層中には、ナクレイン以外にもいくつかの成分が存在すると予想されている。このため本研究では、アコヤガイ殻体真珠層中で真珠層形成に特異的に関与するナクレイン以外の成分の同定とその構造解析を行うことを目的とした。同時に、アコヤガイと近縁種のシロチョウガイ殻体真珠層中から、アコヤガイ有機基質成分と相同の成分を同定し、両成分の構造の比較を行うことで、真珠層形成に関与する配列部分の推定を試みた。

まず、アコヤガイ殻体の真珠層と稜柱層のそれぞれから EDTA またはアルカリを用いて有機基質を抽出し、これらの有機基質成分の SDS-PAGE から得られたバンド成分について N 末端アミノ酸配列分析を行った。その結果、真珠層と稜柱層の両層中に、ナクレインと同じ配列を持つ高分子量成分 (48 kDa) が含まれていることが分かった。一方、ナクレインとは異なるアミノ酸配列を持つ低分子量成分 (13 kDa と 16 kDa) が、真珠層のみに存在することが分かった。この成分をコードする遺伝子を、cDNA クローニングの手法で決定し、タンパク質の一次構造を推定した。この成分の分子量は約 13 kDa と推定されたため、N13 と命名した。N13 の一次構造中には、Gly、Asn、Cys が多く、また Asp と Glu の酸性アミノ酸も多く含まれ、さらに、Gly-Asn から成る特異的な繰り返し配列が存在することが明らかとなった。また、カゼインキナーゼによるリン酸化モチーフやヘパリン結合モチーフに相当する配列の存在が確認された。

ホモロジー検索の結果、N13 と高い相同性を示す成分は存在せず、この成分は、新規のタンパク質であると考えられた。N13 と比較的高い相同性を示す成分としては、塩化シアニン (Mattar, 1994; Scharf and Engelhard, 1993)、真菌のマイコプラズマの *Trichoderma harzianum* の細胞壁タンパク質 (Lora et al., 1994)、ウサギのケラチン (Fratini et al., 1993)、日本住血吸虫の卵殻中のタンパク質 (Henkle et al., 1990) などが存在したが、いずれも極めて短い配列に関する相同性が認められただけであった。

同様の分析をシロチョウガイ殻体の真珠層についても行い、N末端のアミノ酸配列がナクレインと高い相同性を示す高分子量成分 (66 kDa) と、N13 と高い相同性を示す低分子量成分 (14 kDa と 27 kDa) を発見した。後者をコードする遺伝子の同定のために cDNA クローニングを行い、同定したクローンからタンパク質成分の一次構造を推定した。この成分の推定分子量は 14 kDa であったため、N14 と命名した。N14 の一次構造中にも Gly-Asn の繰り返し配列が存在し、アコヤガイの N13 と非常に高い相同性が認められた。

以上の結果より、アコヤガイとシロチョウガイの殻体には、真珠層と稜柱層の両方に含まれるナクレインまたはナクレイン類似成分と、真珠層に特異的に含まれる低分子量成分 (N13/N14) の 2 種類の有機基質成分が存在することが明らかとなった。また、本研究で発見した相同のタンパク質成分 (N13/N14) の一次構造の比較から、酸性アミノ酸、リン酸化部位、Gly-Asn の繰り返し配列部分などが両成分間で非常に良く保存されていることが確認された。このため、これらの配列部分は、この成分の機能と関連した重要な部分の可能性がある。とくに、Gly-Asn の繰り返し配列は、より優れた生鉱物化能力をもつシロチョウガイに存在する N14 の方で N13 よりも長いことや、ナクレイン中にも類似の配列が存在することなどから、殻体形成に関連した重要な機能に係わっていると思われる。

N13 や N14 は、真珠層に固有の成分であるため、真珠層形成におけるイニシエーションの段階で、アラレ石の結晶核形成に関与している可能性が考えられ

る。一方、ナクレインは、真珠層と稜柱層の両方に含まれるため、結晶核の決定には関与せず、結晶核形成後の結晶の成長に関与しているのではないかと考えられる。

本研究より、真珠層形成に関与する N13、N14 有機基質タンパク質成分が発見されたことは、真珠層形成機構、ひいては軟体動物の殻体形成機構の解明にとって重要な前進をもたらすものと考えられる。